

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-122328

(43) 公開日 平成8年(1996)5月17日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/49	A			
G 0 1 B 11/16	G			
G 0 1 N 11/00	C			
13/04				
15/00	B			

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-263972

(22) 出願日 平成6年(1994)10月27日

(71) 出願人 390014960

東亜医用電子株式会社

兵庫県神戸市中央区港島中町7丁目2番1号

(72) 発明者 井波 圭一

神戸市西区富士見が丘2丁目22-10

(72) 発明者 松本 英彬

神戸市中央区港島中町7丁目2番1号 東亜医用電子株式会社内

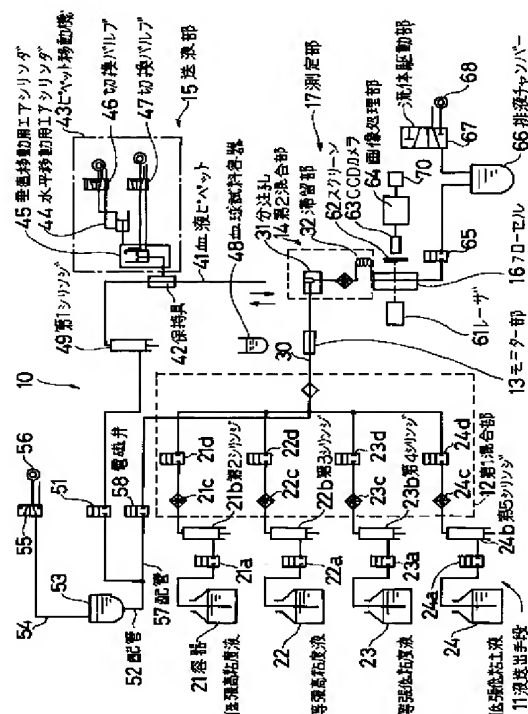
(74) 代理人 弁理士 野河 信太郎

(54) 【発明の名称】 赤血球機能測定方法及びその装置

(57) 【要約】

【目的】 1つの装置を用い簡単な操作で短時間に赤血球の浸透圧変化による変形能とずり応力による変形能とを測定可能である赤血球機能測定方法及びその装置を提供する。

【構成】 赤血球機能測定装置10は、第1液（高粘度低張液）、第2液（高粘度等張液）、第3液（低粘度等張液）、第4液（低粘度低張液）の各希釈液を供給する各液送出手段11と、液送出手段11を選択的に駆動するための各シリンジ21b～24bと、液送出手段11から送出された各希釈液を混合する第1混合部12と、血球を含む試料液を送り出す送液部15と、第1混合部12で作製送出された液と送液部15で送出された血球を含む試料液とを混合し試料懸濁液として送出する第2混合部14と、試料懸濁液中の血球に所定のずり応力を付与するフローセル16と、CCDカメラ63と、画像処理部64とを備えている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 赤血球を含む試料液と、一定の粘度で浸透圧を傾斜変化させた希釈液または一定の浸透圧で粘度を傾斜変化させた希釈液とを混合し、得られる試料懸濁液中の赤血球に応力を付与し、次いで応力を付与された赤血球に光を照射して回折像を得、この回折像から赤血球の変形能を測定することを特徴とする赤血球機能測定方法。

【請求項2】 1つの装置内で行われる請求項1による赤血球機能測定方法。

【請求項3】 使用される希釈液が、赤血球の、浸透圧変化による変形能測定用であり、約5～25cPの範囲の一定の粘度で、約300～300mOsmの範囲の浸透圧で傾斜変化している請求項1又は2による赤血球機能測定方法。

【請求項4】 使用される希釈液が、赤血球の、ずり応力変化による変形能測定用であり、約250～350mOsmの範囲の一定の浸透圧で、約1～25cPの範囲の粘度で傾斜変化している請求項1又は2による赤血球機能測定方法。

【請求項5】 粘度および／または浸透圧の異なる希釈液を供給する複数の液送出手段と、複数の液送出手段を選択的に駆動するための選択駆動手段と、液送出手段から送出された異なる希釈液を混合する第1混合部と、混合された希釈液と赤血球を含む試料液とを混合する第2混合部と、第2混合部で得られる試料懸濁液中の赤血球に応力を付与する応力付与手段と、応力付与された赤血球に光を照射して回折像を形成させる回折像形成手段と、回折像を撮像する撮像手段と、撮像された回折像から赤血球の変形能を解析する解析手段とを備えた赤血球機能測定装置。

【請求項6】 第2混合部が、試料懸濁液をその浸透圧が平衡に達するまでの間滞留させる滞留部を備えてなる請求項5による赤血球機能測定装置。

【請求項7】 第2混合部が、試料懸濁液に乱流を生じさせ均一に混合する乱流発生手段を備えてなる請求項5または6による赤血球機能測定装置。

【請求項8】 複数の液送出手段のいずれかで送出される希釈液が、色素を含有し、前記色素含有希釈液と他の希釈液との混合比を色素濃度の測定によって検出する混合比検出手段を備えてなる請求項5～7のいずれか1つによる赤血球機能測定装置。

【請求項9】 撮像手段が、回折像を撮像するCCDカメラを備えた請求項5による赤血球機能測定装置。

【請求項10】 解析手段が、撮像された回折像の長径、短径を解析することにより赤血球変形指数を演算処

理する請求項5による赤血球機能測定装置。

【請求項11】 応力付与手段が、試料懸濁液中の赤血球を通過させるフローセルである請求項5による赤血球機能測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、赤血球機能測定方法及び測定装置に関し、より詳細には、赤血球変形能試験が行える赤血球機能測定方法及び測定装置に関する。

10 【0002】

【従来の技術】従来、種々の病気の診断方法の1つとして、赤血球検査が行われている。赤血球検査としては、赤血球の浸透圧抵抗性試験（溶血試験）及び、ずり応力変形能試験が知られている。浸透圧抵抗性試験は、赤血球内の浸透圧とこれを取り囲む周囲の浸透圧との差により赤血球を破壊する試験であり、赤血球の浸透圧変化による変形能により赤血球の溶血速度の指標となる浸透圧抵抗性、すなわち、赤血球の脆弱性を測定することができる。これにより健康状態あるいは生理学的状態に関するいくつかの推論を導き出すことができる。また、この試験は、赤血球形態、赤血球粘弾性に左右され、球状赤血球症の鑑別診断上極めて重要な試験となっている。

20 【0003】一方、ずり応力変形能試験は、外力により変化する赤血球の形態を観察する試験である。赤血球は、一般に外力の除かれた状態では直径約8μmの中くばみ円盤状の形態を呈しているが、小さな外力で容易にその形態を変化させ得る。赤血球の変形能は、疾患の有無により低下するとともに、赤血球内部のヘモグロビンの溶解性や濃度、赤血球膜の粘弾性（ATP量、遊離コレステロール、膜蛋白スペクトリン性状）に左右されることが知られている。

30 【0004】

【発明が解決しようとする課題】赤血球浸透圧抵抗性試験は、pH7.4の緩衝液が添加された0.1%～0.9%食塩水系列の試験管に赤血球を入れ、20℃で30分静置した後、遠心分離を行い、上清中のヘモグロビン濃度を測定する方法が知られている。また、コイル状に巻かれた細いチューブのなかを濃度勾配のついた食塩水で満たし、血液試料を添加し37℃で10分静置した後、自公転遠心機により赤血球を細いチューブ内に移動させ、その後、赤血球溶血箇所を測定することにより、赤血球浸透圧抵抗性（CPC法、Coli Planet Centrifuge）を測定する方法が知られている。

40 【0005】しかし、前者の試験においては、濃度の異なった食塩水を何種類も用意する必要があるとともに、遠心分離を行ったり、遠心分離後の上清を分光光度計で測定しなければならず操作が煩雑であり、多数の検体を処理する際は特に煩雑な操作を連続して行う必要がある。また、後者のCPC法においては、細いチューブ内を濃度勾配のついた食塩水で満たす操作、自公転遠心機

による操作、チューブ内で溶血したヘモグロビンの赤色を測定する光度計による操作等の段階があり、非常に煩雑な操作を伴う。また、前者及び後者はともに試験に長時間を要する。

【0006】一方、赤血球のずり応力による変形能を測定する方法としては、従来、2重円筒回転粘度計の円筒間隙に赤血球浮遊液をいれ、外筒を回転させることによりずり応力を発生させて赤血球を変形させ、レーザ光を照射してその回折像を解析することにより赤血球の変形能を測定する装置（商品名エキサイトメータ）が用いられる。しかし、測定毎に、2重円筒回転粘度計の内部の洗浄に手間がかかる上、2重回転筒が回転しているため、レーザ光が照射される位置が相対的に動き続けることとなり、回転筒の歪、汚れ等により回折像が変化する欠点があった。

【0007】さらに、以上の赤血球検査方法においては、赤血球の浸透圧変化による変形能を測定する装置と赤血球のずり応力による変形能を測定する装置は別個のものであるため、両方の測定を合わせて行い多面的な診断を行おうとすれば、測定装置が複雑となり操作面での煩雑性が障害となる。また、使用する溶液の流量が250 μ l/秒程度と微量であるため、浸透圧、粘度が傾斜する液を単に混合により作製するには困難が伴う。この発明の目的は、1つの装置を用い簡単な操作で短時間に赤血球の浸透圧変化による変形能とずり応力による変形能とを測定可能である赤血球機能測定方法及びその装置を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】この発明によれば、赤血球を含む試料液と、一定の粘度で浸透圧を傾斜变化させた希釈液または一定の浸透圧で粘度を傾斜变化させた希釈液とを混合し、得られる試料懸濁液中の赤血球に応力を付与し、次いで応力を付与された赤血球に光を照射して回折像を得、この回折像から赤血球の変形能を測定することを特徴とする赤血球機能測定方法が提供される。

【0009】この発明によれば、粘度および/または浸透圧の異なる希釈液を供給する複数の液送出手段と、複数の液送出手段を選択的に駆動するための選択駆動手段と、液送出手段から送出された異なる希釈液を混合する第1混合部と、混合された希釈液と赤血球を含む試料液とを混合する第2混合部と、第2混合部で得られる試料懸濁液中の赤血球に応力を付与する応力付与手段と、応力付与された赤血球に光を照射して回折像を形成させる回折像形成手段と、回折像を撮像する撮像手段と、撮像された回折像から赤血球の変形能を解析する解析手段とを備えた赤血球機能測定装置が提供される。浸透圧変化またはずり応力変化による赤血球の変形能試験方法を提供

【0010】この発明における赤血球の変形能測定とは、赤血球の浸透圧変化による変形能測定とずり応力による変形能測定の双方を指し、これらの測定が1つの装置内で行われることが好ましい。この発明において使用される希釈液は、赤血球の浸透圧変化による変形能測定用の場合には、約5〜25cPの範囲の一定の粘度で、約300〜30mOsmの範囲の浸透圧で傾斜変化しているものが好ましい。ここで、等張の浸透圧は300 \pm 50mOsmと定義される。

【0011】この発明において使用される希釈液は、赤血球のずり応力変化による変形能測定用の場合には、約250〜350mOsmの範囲の一定の浸透圧で、約1〜25cPの範囲の粘度で傾斜変化しているものが好ましい。この発明における傾斜変化させた希釈液とは、浸透圧の変化による赤血球の変形能試験を行う場合に、例えば、上記した高粘度で低張な浸透圧をもった液を一定の割合で連続的に増加させ、高粘度で等張、即ち、高浸透圧側の液を一定の割合で連続的に減少させながら、総流量を一定に保ちつつ供給されるよう調整された液である。それぞれの傾斜方向は、上記に限定されず逆の場合も可能である。また、ずり応力の変化による赤血球の変形能試験を行う場合においては、例えば、上記した浸透圧が等張で高粘度の液を一定の割合で連続的に増加させ、浸透圧が等張で低粘度の液を一定の割合で連続的に減少させながら、総流量を一定に保ちつつ供給されるよう調整された液である。それぞれの傾斜方向は、上記に限定されず逆の場合も可能である。

【0012】この発明における応力の付与とは、外力により変化する赤血球の形態を観察するために赤血球に外力を付加することを指し、例えば、内径0.2mm程度の通路を有するフローセルに赤血球を含む試料懸濁液を流し、赤血球にずり応力を付与する方法が好ましい。フローセルは断面を矩形とするのが好ましく、また、血球に応力を付与する点から流路断面のアスペクト比が5以上であることが好ましく、10であることがとくに好ましい。この発明において回折像を得るために赤血球に照射する光は、レーザ光が好ましい。レーザ光の種類は、光束が広がらなければ特に限定されない。

【0013】この発明において第2混合部は、試料懸濁液をその浸透圧が平衡に達するまでの間滞留させる滞留部を備えていることが好ましい。この発明において第2混合部は、試料懸濁液に乱流を生じさせ均一に混合する乱流発生手段を備えていることが好ましい。ここで乱流発生手段とは、例えば、混合部に微小な粒子を充填した流路を設け、粒子のわずかな間隙を通る際の流速を上げることによって乱流を発生させるものが挙げられる。この発明において複数の液送出手段のいずれかで送出される希釈液は、色素を含有し、前記色素含有希釈液と他の希釈液との混合比を色素濃度の測定によって検出する混合比検出手段を備えていることが好ましい。混合比検出手段とは、例えば、LEDとフォトダイオードからなる光学的検出手段が挙げられる。

5

【0014】この発明において撮像手段は、回折像を撮像するCCDカメラを備えていることが好ましい。この発明において解析手段は、撮像された回折像の長径、短径を解析することにより赤血球変形指数を演算処理するものが好ましい。赤血球変形指数とは、撮像された回折像が楕円状であるとき、その長径をA、短径をBとすれば、変形指数DIが、 $DI = (A - B) / (A + B)$ で定義されるものをいう。この発明において応力付与手段は、試料懸濁液中の赤血球を通過させるフローセルであるのが好ましい。フローセルは、上記した所定のアスペクト比を有するものが好ましい。

【0015】なお、赤血球機能測定装置は、低粘度で浸透圧が低張である液をも流量可変に送り出す液送出手段を備えているのが好ましい。これにより、低粘度で浸透圧が等張な希釈液と低粘度で浸透圧が低張な希釈液とによる従来の赤血球変形能試験試験を上記した高粘度下での浸透圧あるいは、ずり応力の変化による赤血球の変形能試験とともに1つの装置で行うことができる。

【0016】

【作用】赤血球の浸透圧変化による変形能試験を行う場合には、粘度が等しく浸透圧が異なる2種類の液、例えば、第1および第2液を流量比を連続的に変化させながら液送出手段から送出する。例えば、総流量を一定にして第1液を一定の割合で連続的に増加させ、第2液を一定の割合で連続的に減少させるよう液送出手段を駆動する。次にこれらを液送出手段により送出し、第1混合部で混合させる。次に、第2混合部でその混合液に血液試料を一定比率で加え血球懸濁液とする。第2混合部の滞留部では、血球懸濁液をその浸透圧が平衡に達するまでの間滞留させる。浸透圧が低いと、赤血球は球形化し容積を増す。血球懸濁液はアスペクト比の大きいフローセルに導かれレーザー光が照射される。これにより、散乱回折像が生じる。

【0017】散乱回折像は赤血球の変形程度により変化する。散乱回折像をCCDカメラにて撮像し、撮像された回折像を演算処理することにより、浸透圧変化に基づく赤血球の変形能（面積）を測定する。このように2種類の液の流量比を連続的に変えつつ上記測定を行うことにより、浸透圧をパラメータとする赤血球の変形能試験が実施できる。高粘度状態で浸透圧を変化させて変形能を測定する場合には、大きなずり応力を加えることができるので、加速試験となり測定の迅速化が可能となる。

【0018】この発明にかかる赤血球機能測定方法では、赤血球のずり応力変化による変形能試験を行う場合、まず浸透圧が等しく粘度が異なる2種類の液、例えば、第2および第3液を流量比を連続的に変化させながら液送出手段から送出する。総流量を一定にして第2液を一定の割合で連続的に増加させ、第3液を一定の割合で連続的に減少させるよう液送出手段を駆動する。次にこれらを液送出手段により送出し、第1混合部で混合さ

6

せる。次に、第2混合部でその混合液に血球試料を一定比率で加え血球懸濁液とする。次に、血球懸濁液をアスペクト比の大きいフローセルに導く。フローセル中で赤血球は混合液の流速、粘度により定まる応力（ずり応力）が加えられ形態変化をおこし、変形する。フローセルにはレーザー光が照射されており、その散乱回折像は赤血球の変形程度により変化する。散乱回折像をCCDカメラにて撮像し、撮像された回折像を演算処理することにより、赤血球の変形能（変形指数）を測定する。このように、2種類の懸濁液の流量比を連続的に変えつつ上記測定を行うことにより、粘度をパラメータとする赤血球の変形能測定が実施できる。

【0019】なお、赤血球に加わる応力を変化させるには、粘性を変えなくても流速を変えることにより可能と考えられるが、大きな応力を加えるためには多量の液をフローセルに導かねばならない。また、血球懸濁液中の血球濃度を一定に維持するのが難しく、レーザー光照射領域における血球の流速が一定にならないので、測定条件の変動をもたらすことになる。したがって、粘性を変える本願方式においては上記のような問題を生じることがない。

【0020】この発明にかかる赤血球機能測定装置では、上記したいずれの変形能試験を行う場合でも、混合された液は、第2混合部に送出される。このとき、混合検知手段により液に予め混合された色素をモニタすれば、測定する瞬間の液の状態により、液の浸透圧あるいは粘度を確認することができる。すなわち、浸透圧あるいは粘度と色素濃度、及び色素濃度と吸光度の関係を計算上及び実験で求めておけば、吸光度から浸透圧あるいは粘度をリアルタイムで求めることができる。これにより、設定通りに混合されたか否かを判断することができる。

【0021】送出された二液は、第2混合部で試料液送出手段により送出された血球を含む試料液が混合され試料懸濁液となる。第2混合部が滞留部を有しておれば、試料懸濁液は平衡に達してからフローセルへ送出される。このため、最適な条件下での測定が可能となる。さらに、第2混合部が前記したような乱流発生手段を有しておれば、混合部の容積を小さくしても効率の高い混合が可能となる。乱流発生手段が、微小な粒子を充填したものであればより好ましい。さらに、この発明の装置では低粘度で浸透圧が低張である、例えば、第4液と、低粘度で浸透圧が第1液より高張な前記第3液とを選択して上記同様に送り出せば低粘度下における赤血球の浸透圧変化による変形能試験を行うことができる。これにより、従来から行われている低粘度下における赤血球の浸透圧変化による変形能試験を高粘度下における上記した変形能試験とともに1つの装置で行うことができる。

【0022】

【実施例】図1は、この発明の一実施例による赤血球機

能測定装置を示す。赤血球機能測定装置10は、希釈液を供給する液供給手段11、第1混合部12、モニター部13、第2混合部14、送液部15、フローセル16及び測定部17からなる。液送出手段11は、容器21～24、電磁弁21a～24a及びシリンジ21b～24bが配管で接続され構成されている。シリンジ21b～24bは、図示しない駆動源を有している。これにより、4種類までの懸濁液をシリンジ21b～24bの下流側に送出することができる。シリンジ21b～24bの下流側には、第1混合部12が接続されている。

【0023】第1混合部12は、キャビティ21c～24cおよび電磁弁21d～24dから構成されている。キャビティ21c～24cは、図2に示すように、ヒーター25を有する恒温ブロック26内に形成されている。第1混合部12の下流側にはモニター部13が接続されている。モニター部13は、図3に示すように、LED27、フォトダイオード28及び保持具29からなる。保持具29は、遮光性材料で形成されLED27とフォトダイオード28とを同軸上に固定している。LED27とフォトダイオード28の間には、第1混合部12から導出された配管30が配置されている。配管30は、テフロン（PTFE）製の透明チューブであり、保持具29を貫通して配置されている。このような構成によりモニター部13を通過する液体が後述する色素を含有するとき、この液体をモニターすることができる。モニター部13の下流側には、第2混合部14が接続されている。

【0024】第2混合部14は、図4に示すように、分注孔31と、通過する液体を任意の時間だけ滞留させるための滞留部32とから主に構成されている。分注孔31は、後述する血液分注用のピペット41の先端が挿通可能な口径を有している。分注孔31の下端には、滞留部32が接続されている。滞留部32は、コイル状の細管33と、細管33の前後に充填された乱流発生手段としてのビーズ34とから主に構成されている。ビーズ34は、ストッパー35により送液方向の前後で固定されている。ビーズ34は、血液を変質したり悪影響を及ぼさない材料、例えば、シリコンコーティングが施されたガラス、アルミナ、あるいはジルコニアが好ましい。第2混合部14の図中上方には、送液部15が配置されて

いる（図1）。
【0025】この実施例では、乱流発生手段としてビーズ34を充填したが、それ以外の手段として、例えば、流路が縮小、拡大を繰り返す方法、あるいは不規則な形状を呈する充填材を充填する方法を用いても可能である。送液部15は、分注用のピペット41と、ピペット41を保持する保持具42と、保持具42を2軸方向に移動させるピペット移動機構43とから構成されている。ピペット移動機構43は、保持具42を水平及び垂直方向に移動させるエアシリンダ44、45と、エアシ

リンダ44、45を制御する切り換えバルブ46、47とから主に構成されている。ピペット移動機構43は、ピペット41の先端を、分注孔31と、分注孔31の近傍に配置された血球試料容器48との間で移動させることができる。切り換えバルブ46は水平方向移動用の、切り換えバルブ47の垂直方向移動用のエアシリンダ切り換えバルブである。

【0026】ピペット41の上端は、血球を含む試料液を分注する第1シリンジ49の吐出側に接続されている。第1シリンジ49は、図示しない駆動源を有している。第1シリンジ49の吸引側は電磁弁51、配管52を介して洗浄液密閉容器53の排出側に接続されている。密閉容器53の内部には配管54の一端が開口している。配管54の他端は弁55を介して圧力源56に接続されている。配管52には分岐配管57が接続されている。配管57は、電磁弁58を介して第1混合部12に接続されている。このような構成により、ピペット41が血球試料容器48内の血液試料を分注孔31に分注することができるとともに、密閉容器53に収納された洗浄液を分注孔31に注入することができる。第2混合部14の下方には、フローセル16が配置されている。

【0027】フローセル16は、図5で示すように、透光性を有する直方体ブロックで構成され、ブロックの長手方向を軸として断面形状が矩形の管路59を有している。管路59は、2mm×0.2mm、すなわち、アスペクト比の値が10の断面形状を有している（図1）。フローセル16の前後には、測定部17が配置されている。測定部17は、発光手段であるヘリウムネオンレーザー61と、スクリーン62と、CCDカメラ63と、画像処理部64とから主に構成されている。レーザー61は、光路軸が管路59の断面の長手方向と直交するように配置されている。スクリーン62は、フローセル16を間に挟んでレーザー61の照射部と対向して配置されている。スクリーン62は、図6に示すように、強度の強い直接光を遮光できる直接光遮光部62aが設けられている。直接光遮光部62aは、直接光を遮光できるように位置が調整されている。これにより、レーザー61から発せられたレーザー光はセル16の中を流れている赤血球の形状に応じて散乱回折し微弱な散乱光をもスクリーン62に投影される。

【0028】投影された散乱回折光像は、スクリーン62に後置されたCCDカメラ63で撮像され、例えば、1/30秒ごとの像が得られる。撮像された像は適当なレベルで2値化され、画像処理部64に入力データとして取り込まれる。画像処理部64は、入力データを基に画像処理を行う。この結果は、画像処理部64に接続されたCRT70に表示される。一方、フローセル16の下方には、電磁弁65を介して排液チャンバー66が接続されている。さらに、排液チャンバー66には電磁弁67及びポンプ68からなる流体駆動部が接続されてい

る。このような構成により、滞留部32からフローセル16へ所定量の試料液体及び洗浄液を流通させることができる。

【0029】図7は、赤血球機能測定装置10のブロック構成図である。赤血球機能測定装置10は、CPU、ROM、RAM、タイマー、カウンタ等を有するマイクロコンピュータを含む制御部71を有している。制御部71には、キー入力部72及びフォトダイオード28が接続されている。また、制御部71には、各電磁弁21a、22a、23a、24a、51、55、58、67、21d、22d、23d、24d、シリンジ21c、22c、23c、24c、ポンプ46、47、LED27、レーザ61、CCDカメラ63、ヒータ25、CRT70および他の入出力部73が接続されている。

【0030】次に、この実施例の赤血球機能測定装置10の動作について図8のフローチャートに基づき説明する。ステップS1では、初期設定を行う。ステップS2では、液供給工程としての第1混合工程を実行する。第1混合工程では、容器21～24に収納された希釈液のうちの少なくとも2種類の希釈液を混合する。ステップS3では、試料懸濁液混合工程としての第2混合工程を実行する。第2混合工程では、第1混合工程で作製された希釈液と、血球を含む試料液とを混合する。

【0031】上記ステップS2およびS3の具体例を図9のフローチャートに基づき説明する。まず、準備として第1～4液としての4種類の希釈液、すなわち、①低張高粘度液、②等張高粘度液、③等張低粘度液、④低張低粘度液がそれぞれ入った容器21～24をセットする。この装置10では、赤血球の浸透圧変化による変形能試験を高粘度下で行う場合には①低張高粘度液、②等張高粘度液を選択的に使用する。また、赤血球のずり応力変化による変形能試験を行う場合には②等張高粘度液、③等張低粘度液を選択的に使用する。さらに、赤血球の浸透圧変化による変形能試験を低粘度下で行う場合には③等張低粘度液、④低張低粘度液を選択的に使用する。

【0032】この実施例において、等張とは浸透圧が $300 \pm 50 \text{ mOsm}$ 、低張とは $30 \pm 25 \text{ mOsm}$ と定義する。また、高粘度とは $5 \sim 25 \text{ c.P.}$ （センチポイズ）、低粘度とは $1.0 \sim 2.0 \text{ c.P.}$ と定義する。これらの溶液はリン酸緩衝液あるいはヘス緩衝液（ $5 \sim 40 \text{ mM}$ 、 $\text{pH} 7.40$ ）をベースに粘度を高くする場合にはポリビニルピロリドン（平均分子量約360000）あるいはデキストラン（平均分子量約40000）を適当な粘度になるように加えたものを使用する。また、浸透圧は塩化ナトリウムの濃度で調整する。液の粘度が $5 \sim 25 \text{ c.P.}$ を越えると、液の移送が困難となる。

【0033】4種類の上記液のうち、使用する液の1つには色素が添加されているのが好ましい。添加される色素は、赤血球が形態変化しないこと、赤血球平均容積

（MCV）が変化しないこと、水溶性であること、低濃度で吸光度が十分変化することが必要な条件となる。この実施例ではスルフォローダミン-B、アストラゾンレッド6B、ディアリルブリリアントピンクR-N、ブリリアントピンク6Bが好ましい。図9において、まず、ステップS11では、測定項目の初期設定を行う。ここでは、キー入力部72から入力する。最初に、赤血球の浸透圧変化による変形能試験を高粘度下で行う場合について説明する。この場合、使用する希釈液は、4種類の希釈液のうちの①低張高粘度液、及び②等張高粘度液である。上記液のうちの方、例えば②には、色素が $0.01 \text{ w/v} \%$ 程度添加されている。初期設定が終了すると、ステップS12へ移行する。

【0034】ステップS12では、ピペット移動機構43を駆動させピペット41の先端を血球試料容器48内に移動させる。ステップS13では、第1シリンジ49を吸液させる。所定量の血液試料液が第1シリンジ49に吸引されると、ステップS14において第1シリンジ49の駆動を停止する。次に、ステップS15では、ピペット移動機構43を駆動させピペット41の先端を第2混合部14の分注孔31に移動させる。

【0035】次に、ステップS16では、電磁弁21aを開く。次に、ステップS17では、第2シリンジ21bを吸引駆動させる。次に、ステップS18では、電磁弁21aを閉じ、電磁弁21dを開く。上記ステップS16と略同時に、ステップS19では、電磁弁22aを開く。次に、ステップS20では、第3シリンジ22bを吸引駆動させる。これにより、所定量の液が各シリンジ21b、22bに注入される。次に、ステップS21では、電磁弁22aを閉じ、電磁弁22dを開く。

【0036】次に、ステップS22では、第2シリンジ21bと第3シリンジ22bとを吐出駆動させる。このとき2つのシリンジは、総流量を一定にして流量比が時間的に連続して変化するように各液を吐出する。すなわち、一方の液は流量が次第に増大し、他方の液は流量が次第に減少する。吐出された各液は、キャビティ21c、22cに送出され2種類の液が混合される。このようにして、浸透圧特性が連続的に変化する希釈液を作製することができる。次に、ステップS23では、第1混合部12において混合された液を、モニター部13においてモニターする。ここでは、予め液に含有された色素により第1混合部12で作製された液は、色素濃度が連続的に変化した液となる。この懸濁液がモニター部13の配管30のなかを流れると、色素の濃度の変化が吸光度の変化としてモニターされる。予め色素濃度と流量比の関係を調べておけば流れている液体の性状がリアルタイムで確認できる。

【0037】次に、ステップS24では、第1シリンジ49を吐出駆動させる。これにより、第2混合部14の分注孔31に所定量の血液試料液が注入される。そし

11

て、血液試料液と希釈液とが混合され滞留部32に導かれる。次に、ステップS25では、滞留部32において所定の滞留時間が経過したか否かを判断する。滞留部32では、赤血球が浸透圧により変化しこの変化が平衡に達するまで、試料懸濁液が滞留する。所定の滞留時間が経過すると、図8のフローチャートのステップS4に移行する。ステップS4では、滞留部32を経た懸濁液がフローセル16の管路59に導入され赤血球の回折像から赤血球の形態が測定される。

【0038】まず、第2または第3シリンジ21b、22bを吐出駆動させフローセル16に懸濁液を流すことにより、懸濁液には管路59内において所定のずり応力、すなわち、浸透圧変化によって赤血球変形能規定因子である表面積／体積、内部粘度が変化した赤血球を変形させようとする外力が作用する。これにより、赤血球は前記ずり応力により、変形する。レーザ61からの発光により、スクリーン62上には、変形した赤血球の散乱回折光像が投影される。CCDカメラ63で捉えられた散乱回折光像は、画像処理部64においてリアルタイムで画像処理され、時間的に連続して赤血球の変形の程度が求められる。赤血球の変形の程度は、例えば、変形指数から求めることができる。図10に示すように、撮像された回折像が図のような楕円状であるときその長径をA、短径をBとすると変形指数DIは次式に定義される。

【0039】

$$DI = (A - B) / (A + B) \cdots \text{〔式1〕}$$

この高粘度浸透圧変形能試験では、前述のように、4種類の希釈液のうち、①低張高粘度液および②等張高粘度液を使用している。これらの液は粘度が高いので、セル16を流れる赤血球には大きなずり応力が作用する。浸透圧が低い場合には赤血球は本来の形状である中くぼみ円盤状から球形化し、その容積が増して変形しにくくなる。よって、変形指数DIは小さくなる。モニター部13で吸光度法による求めた浸透圧をパラメータにしてこの変形指数をグラフ化することにより高粘度溶血曲線が得られる(図12)。測定例を図11に示す。さらに、図12を微分すると図13のようになる。図中においてA：変形能最大点、B：変形能最大変化点、C：変形能最小点と名付ける。

【0040】ステップS4での測定が終了すると、ステップS5に移行する。ステップS5では、ピペット41、第1及び第2混合部12、14及びフローセル16の洗浄を行う。まず、第1シリンジ49のピストンを吸引位置までもどす。次に、電磁弁51、55、58を開き、ポンプ56を駆動する。これにより、洗浄液53は、配管52、第1シリンジ49およびピペット41を通過して第2混合部14に流れる。また、洗浄液53は、配管52、30を通過して第2混合部14に流れる。第2混合部14を通過した洗浄液53は、フローセ

12

ル16を通過して排液チャンバー66に貯留される。排液チャンバー66に洗浄液53が貯まれば、電磁弁67を開いてポンプ68を駆動し、洗浄液53を系外に排出する。洗浄が終了するとステップS6に移行し、次の測定まで待機しその他の処理を行う。

【0041】〔赤血球のずり応力変化による変形能試験を行う場合〕この試験では、4種類の懸濁液のうち、容器22の②等張高粘度液、および容器23の③等張低粘度液を使用する。容器24内には色素が添加されている。この場合、等張状態において粘度がパラメータとなる。粘度が高い場合にはずり応力が赤血球に作用し、引き伸ばされた形状になる。この場合の散乱回折像も同じような楕円形状になる。同じ大きさのずり応力が作用したとき、どの程度引き伸ばされるかは赤血球自身の変形能に依存する。つまり変形の程度を調べれば赤血球の変形能を調べることができる。モニター部13で吸光度法による求めた粘度をパラメータにして変形指数を連続的に算出し、それをグラフ化することにより、ずり応力曲線が得られる(図17)。測定例を図14～16に示す。図14は変形指数、図15は回折像の面積、図16は長径及び短径を測定したものである。ずり応力をそれぞれパラメータとしたものである。図17を微分すると図18のようになる。図中においてA：変形終了ずり応力、B：変化最大ずり応力、C：変化開始ずり応力と名付ける。

【0042】〔赤血球の浸透圧変化による変形能試験を低粘度下で行う場合(従来の試験)〕この試験では、4種類の懸濁液のうち、容器23の③等張低粘度液、および容器24の④低張低粘度液を使用する。この場合、等張状態において浸透圧がパラメータとなる。浸透圧が低い場合には、赤血球は本来の赤血球の形状である中くぼみ円盤状から球形化しその容積を増す。浸透圧が等張のときは赤血球は中くぼみ円盤状をしており流れのなかではいろいろな方向を向いて流れているため、スクリーン上の回折像は円形状である。浸透圧が下がると赤血球は球形化し、容積を増す。球形化することによりランダムであった散乱は一樣になり、回折像の大きさは小さくなる。浸透圧(吸光度法によるモニター部より求めることができる)をパラメータにしてこの回折像の大きさ面積とグラフ化することにより図22の溶血曲線を求めることができる。横軸は左から右へ浸透圧が低くなっている。また、この場合、周囲長および、径も重要な情報である(面積の情報と成りうる)。図19に面積、図20に周囲長、図21に長径、短径の測定例のグラフを示す。

【0043】図22の面積のグラフを例に説明する。ここでA：溶血開始点、B：溶血ピーク点、C：50%溶血点、D：溶血終了点と名付ける。これらの点が浸透圧の低い側へシフトするか高い側へシフトするかで膜の抵抗が亢進しているか低下しているかがわかる。このよう

に、上記実施例による赤血球機能測定方法では、浸透圧または粘度が異なる4種類の液を任意に選択でき、かつその混合比率を任意に連続的に変化させることができるので、浸透圧抵抗性試験および各種の赤血球変形能試験を連続して行うことができる。さらに、浸透圧変化による変形能試験では、高粘度下で浸透圧を変えるので、浸透圧変化による赤血球変形能規定因子である表面積／体積の比率変化（すなわち、球形化）の影響、内部粘度の変化（すなわち、赤血球内ヘモグロビンの濃度変化）の影響がわかるという利点がある。また、従来と同様に低粘度下で浸透圧を変える浸透圧抵抗性試験（溶血試験）も合わせて行える。

【0044】一方、赤血球変形能試験を等張、高粘度で行えるので、生理的浸透圧下での変形能、つまり、生体内での赤血球の変形能を推定できるという利点がある。赤血球機能測定装置10は、浸透圧または粘度が異なる4種類の希釈液を収納した容器21～24が、第1混合部12に選択可能に接続されているので、配管の切り換え操作で任意の希釈液と血球試料液とを混合することができる。したがって、簡単な構造で赤血球の機能を多面的に捉えることが容易となる。また、所定の試験が終了した後に、血球試料を分注したピペット41を用いて流路に洗浄液を送出できるので、洗浄操作の煩雑さが解消され、連続して異なるパラメータを用いた試験に移行することができる。

【0045】この装置10では、第2混合部14が滞留部32を有しているので、血液懸濁液の浸透圧が平衡に達した後、フローセル16に試料懸濁液を送出することができる。したがって、測定精度を高めることができる。モニター部13は、懸濁液に添加した色素濃度に基づいて混合された懸濁液の浸透圧及び粘度を監視できるので、正確に混合された懸濁液をフローセル16に送出することができる。したがって、測定精度を高めることができる。

【0046】測定部17には、レーザー61からの散乱回折像を撮像するCCDカメラ63を有しているので、散乱回折像の大きさ、面積をデータとして出力し容易に数値化させることができる。フローセル16は、アスペクト比が大きいので、血球にずり応力を効果的に作用させることができる。また、従来の2重円筒回転粘度計を使用したエキサイトメータのように、内部の洗浄に手間がかからない。また、スクリーン62が固定されているため、上記の回転計器を使用した場合と違って回転の歪、汚れ等により回折像が変化することがない。さらに、従来の溶血試験のように、濃度の異なった食塩水を何種類も用意する必要もないし、これに遠心分離を行ったり、遠心分離後の上清を分光光度計で測定するといった煩雑な操作が不要である。また、CPC法のように、赤血球浸透圧抵抗性の測定しかできないといった問題が解消され、多数の検体を迅速に処理することができる。

【0047】

【発明の効果】この発明にかかる赤血球機能測定方法では、血球を含む試料液と一定の粘度で浸透圧を傾斜変化させた希釈液とを混合して赤血球の浸透圧変化による変形能試験を行い、血球を含む試料液と一定の浸透圧で粘度を傾斜変化させた希釈液とを混合して赤血球のずり応力変化による変形能試験を行うことができる。これらの試験は、1つの装置で行われるので、試験装置の簡略化および操作の容易化を図ることができる。さらに、赤血球機能測定装置が、低粘度で浸透圧が低張である希釈液を送出する液送出手段を備えておれば、低粘度下で浸透圧を変化させる従来の浸透圧変形能試験（溶血試験）をも1つの装置で行うことができる。血球を含む試料液と高粘度で浸透圧を傾斜変化させた希釈液とを混合して上記変形能試験を行えば、加速試験が可能となり、測定時間の短縮が図れる。

【0048】浸透圧変化による変形能試験では、高粘度下で浸透圧を変えるので、浸透圧変化による赤血球変形能規定因子である表面積／体積の比率変化（すなわち、球形化）の影響、内部粘度の変化（すなわち、赤血球内ヘモグロビンの濃度変化）の影響がわかるという利点がある。一方、赤血球変形能試験を等浸透圧下で高粘度で行えるので、生理的浸透圧下での変形能つまり生体内での赤血球の変形能を推測できるという利点がある。第2混合部が、作製した試料懸濁液を、その浸透圧が平衡に達するまでの間滞留させる滞留部を備えておれば、条件の整った試料懸濁液をフローセルに送出できる。さらに、第2混合部が乱流発生手段を備えておれば、微小流量でかつ高粘度の希釈液が所定の傾斜変化を形成できるよう混合が可能となる。特に、乱流発生手段が微小な粒子を充填した混合部を備えておれば、粒子間の間隙を通過する乱流により効率のよい混合が可能となる。このように、赤血球変形能試験のみならず浸透圧変化による変形能試験、赤血球浸透圧抵抗性試験をも1つの装置で行える。また、赤血球浸透圧抵抗性試験の測定精度を高めることができる。

【0049】複数の希釈液のうちで、混合される2つの液体の少なくとも1つに色素が溶解されており、色素の濃度変化により第1混合部で混合された液の混合比を検知する混合比検知手段を備えておれば、第1混合部で混合された液の色から液の特性、すなわち、粘度、浸透圧をモニタすることができるので、より精度の高い測定が行える。撮像手段は、回折像を撮像するCCDカメラを備えているので、回折像の数値的処理が容易に行える。解析手段は、撮像された散乱回折像の長径、短径、周囲長、面積を解析することにより赤血球変形指数を演算処理するので、従来のように電気的検知法、あるいは、目視による観察を行わなくとも、正確で迅速な測定が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明の一実施例による赤血球機能測定装置の配管図。

【図2】図1の赤血球機能測定装置を構成する第1混合部の概略図。

【図3】図1の赤血球機能測定装置を構成するモニター部の概略図。

【図4】図1の赤血球機能測定装置を構成する第2混合部の概略図。

【図5】図1の赤血球機能測定装置を構成するフローセルを通過するレーザ光及びスクリーンを示す概略図。

【図6】図5のスクリーンの正面図。

【図7】赤血球機能測定装置の制御部のブロック図。

【図8】赤血球機能測定装置の制御部のフローチャート。

【図9】図8の混合工程のフローチャート。

【図10】赤血球変形指数を説明するための説明図。

【図11】浸透圧変化による変形能試験の測定例を示すグラフ。

【図12】浸透圧変化による変形能試験により得られた変形能曲線のグラフ。

【図13】図12の浸透圧変化による変形能曲線を微分して得られたグラフ。

【図14】赤血球変形指数と粘度との関係を示す、ずり応力変化による変形能試験の測定例グラフ。

【図15】赤血球の散乱回析像の面積と粘度との関係を示す、ずり応力変化による変形能試験の測定例グラフ。

【図16】長径あるいは短径と粘度との関係を示す、ずり応力変化による変形能試験の測定例グラフ。

【図17】ずり応力試験により得られた変形能曲線のグ

ラフ。

【図18】図17の変形能曲線を微分して得られたグラフ。

【図19】赤血球散乱回析像の面積と浸透圧との関係を示す溶血試験の測定例グラフ。

【図20】赤血球散乱回析像の周囲長と浸透圧との関係を示す溶血試験の測定例グラフ。

【図21】赤血球散乱回析像の外径と浸透圧との関係を示す溶血試験の測定例グラフ。

【図22】溶血試験により得られた溶血曲線のグラフ。

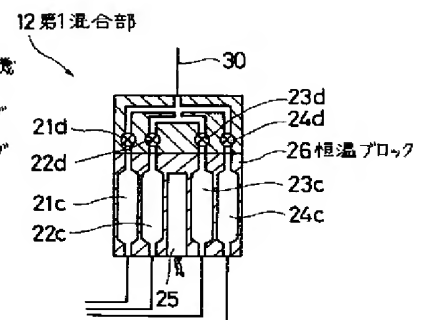
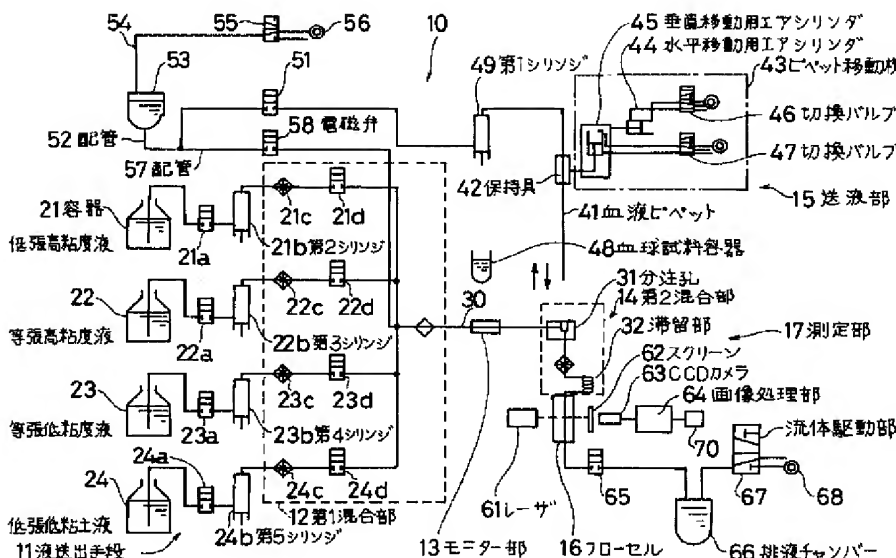
【図23】図22の溶血曲線を微分して得られたグラフ。

【符号の説明】

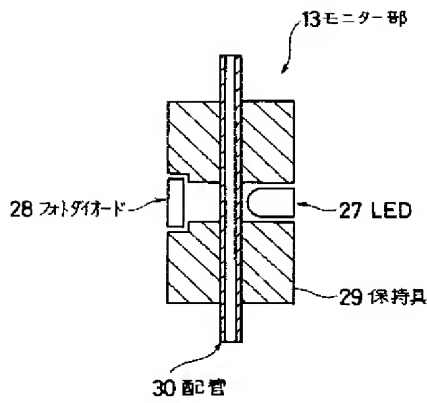
10	赤血球機能測定装置
11	液送出手段
12	第1混合部
13	モニター部（混合比変化検知手段）
14	第2混合部
15	送液部（試料液送出手段）
16	フローセル
17	測定部
21～24	容器
21b～24b	シリンジ（選択手段）
21c～24c	キャビティ
32	滞留部
41	ピペット
62	スクリーン（回析像発生手段）
63	CCDカメラ（撮像手段）
64	画像処理部（解析手段）

【図1】

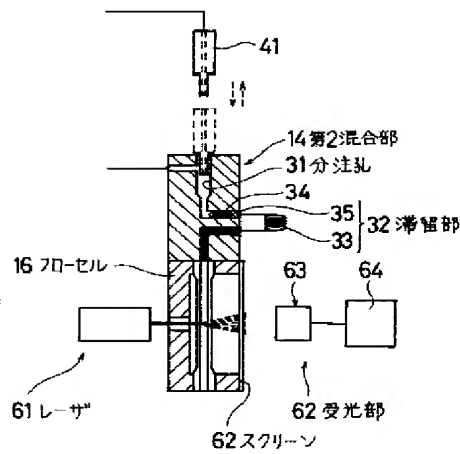
【図2】



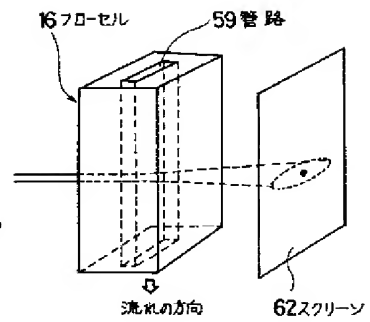
【図3】



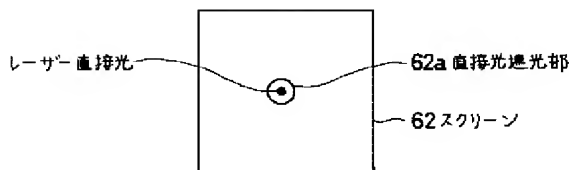
【図4】



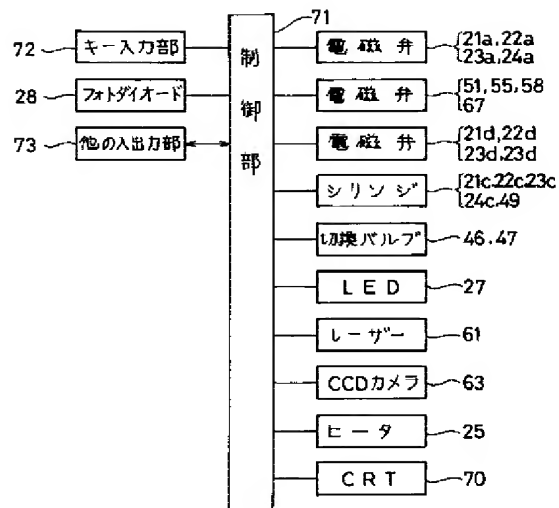
【図5】



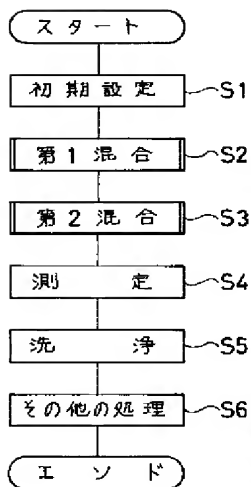
【図6】



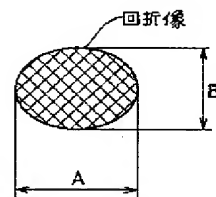
【図7】



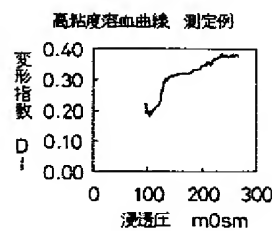
【図8】



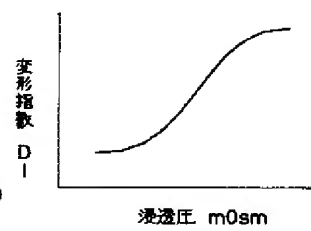
【図10】



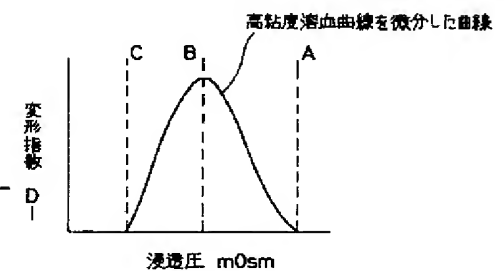
【図11】



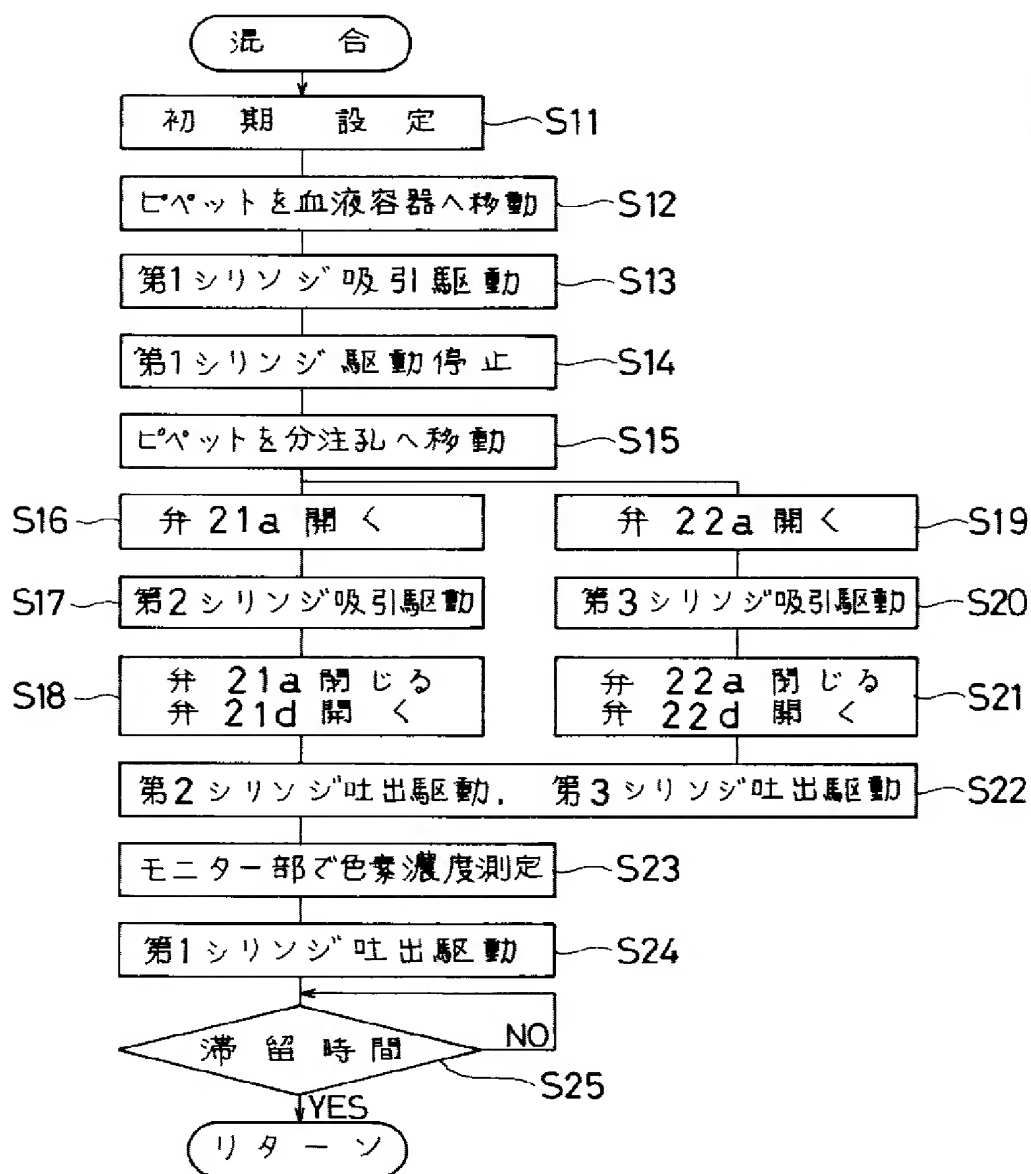
【図12】



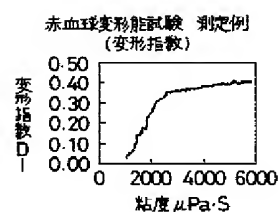
【図13】



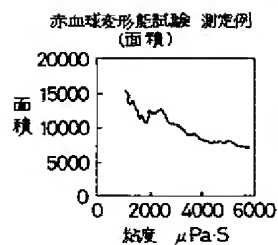
【図9】



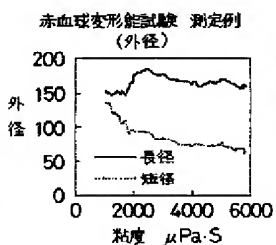
【図14】



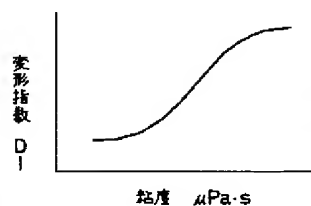
【図15】



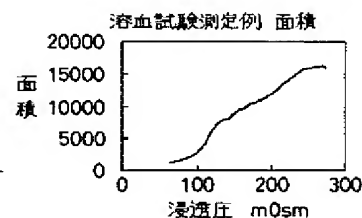
【図16】



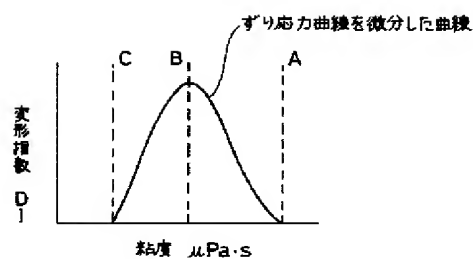
【図17】



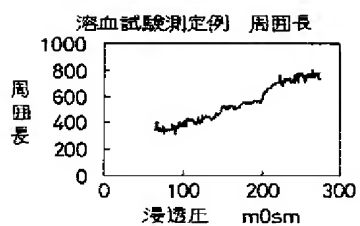
【図19】



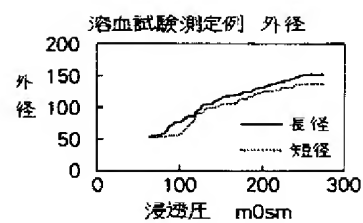
【図18】



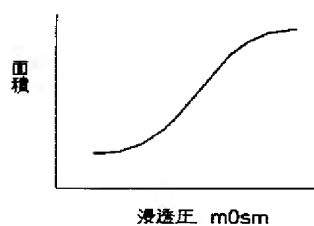
【図20】



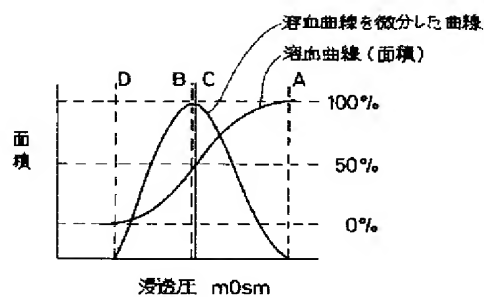
【図21】



【図22】



【図23】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

G 0 1 N 21/47

21/85

// G 0 1 N 33/50

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A

A

L

PAT-NO: JP408122328A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08122328 A
TITLE: METHOD AND APPARATUS FOR
MEASUREMENT OF FUNCTION OF
RED BLOOD CORPUSCLE
PUBN-DATE: May 17, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
INAMI, KEIICHI	
MATSUMOTO, HIDEAKI	

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
TOA MEDICAL ELECTRONICS CO LTD	N/A

APPL-NO: JP06263972
APPL-DATE: October 27, 1994

INT-CL (IPC): G01N033/49 , G01B011/16 ,
G01N011/00 , G01N013/04 ,
G01N015/00 , G01N021/47 ,
G01N021/85 , G01N033/50

ABSTRACT:

PURPOSE: To measure the deformation capability of a red blood corpuscle due to a change in an osmotic pressure and due to a shearing stress simply, quickly and by one apparatus by a method

wherein a diluent whose osmotic pressure and viscosity have been subjected to a gradient change is mixed with a blood sample, a stress is applied to the red blood corpuscle in a sample suspension and a diffraction image is obtained.

CONSTITUTION: A blood pipette 41 is moved into a blood-corpuscle sample container 4 by means of a pipette movement mechanism 43, and a blood sample in a prescribed quantity is sucked by a syringe 49 so as to be injected into a dispensing hole 31 in a mixing part 14. At the same time, a hypotonic high-viscosity liquid and an isotonic high-viscosity liquid are sucked from containers 21, 22 by means of syringes 21b, 22b, they are sent out to cavities 21c, 21c in a mixing part 12 so as to be mixed, a diluent in which an osmotic-pressure characteristic is changed continuously is generated, the diluent is sent to the dispensing hole 31 via a monitor part 13 so as to be mixed 14 with the blood sample, a sample suspension which has been obtained is made to stay 32 for a prescribed time, the sample suspension is introduced into a pipe passage for a flow cell 16, and the shape of a red blood corpuscle is measured on the basis of the beam of diffracted light of the red blood corpuscle which has been caught by a CCD camera 63. Also the change capability due to the shearing stress of the red blood corpuscle can be measured by nearly the same operation inside the same apparatus.

COPYRIGHT: (C)1996, JPO